

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 02165

(54) Colle servant à réunir des tissus humains ou d'animaux, procédé permettant sa fabrication et application d'une telle colle.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 8). A 61 K 35/16; A 61 L 15/04.

(22) Date de dépôt..... 31 janvier 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Autriche, 15 février 1979, n° A 1189/79.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 37 du 12-9-1980.

(71) Déposant : Société dite : IMMUNO AG FÜR CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRODUKTE, résidant en Autriche.

(72) Invention de : Otto Schwarz, Yendra Linnau, Franz Löblich et Thomas Seelich.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein, 20, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention se rapporte à une colle pour des tissus humains ou d'animaux, à base de protéines humaines ou animales, contenant du fibrinogène et du facteur XIII.

5 Il est depuis longtemps connu d'utiliser des substances favorisant la coagulation du sang pour arrêter des hémorragies ou refermer des blessures. Dans les premières propositions qui ont été faites dans ce domaine, on a tout d'abord utilisé des tampons ou des plaquettes
10 de fibrine. Au cours de la seconde guerre mondiale, on a proposé de réaliser des collages de tissus à l'aide de plasma sanguin.

Récemment, H. Matras et d'autres scientifiques, ont décrit dans le "Wiener Medizinischen Wochenschrift"
15 (hebdomadaire médical viennois), 1972, page 517, une colle pour tissus à base de fibrinogène et de facteur XIII pour les transplantations de nerfs interfasciculaires sans suture dans des expériences sur des animaux.

Une autre étude a été publiée par Spängler et
20 d'autres scientifiques dans la revue "Wiener Klinischen Wochenschrift", (hebdomadaire clinique viennois), 1973, pages 1 à 7. Dans ce cas encore, des expériences réalisées sur des animaux ont montré qu'à l'aide de fibrinogène comme cryoprécipité et de thrombine, on pouvait réaliser
25 le collage de tissus.

Ces préparations connues n'ont toutefois pas donné entièrement satisfaction étant donné qu'elles ne remplissent pas d'une manière suffisante toutes les exigences imposées à une telle colle pour tissus, qui sont les
30 suivantes :

- a) importante résistance à la charge des collages ou des cicatrisations de blessures avec arrêt efficace et durable des hémorragies, c'est-à-dire bonne adhérence de la colle sur les surfaces de la blessure ou du tissu
35 ainsi qu'une importante résistance interne de ladite colle;
- b) stabilité réglable du collage dans le corps;
- c) possibilité de résorption totale de la colle au

cours du processus de guérison de la blessure;

d) propriétés favorisant la guérison de la blessure.

Ceci semble partiellement imputable au fait que les facteurs de coagulation nécessaires à l'arrêt de l'hémorragie dans les préparations connues ne présentent pas réciproquement le rapport optimal et également du fait que l'activité fibrinolytique dans la zone de collage est insuffisamment maîtrisée. On constate souvent une dissociation prématurée des collages de tissus du fait de l'activité enzymatique.

La présente invention a donc pour but de supprimer ces inconvénients et difficultés et de créer une colle pour tissus lyophilisée d'origine humaine ou animale, qui remplit largement les exigences mentionnées ci-dessus et se présente sous une forme lyophilisée, cette forme de présentant étant indispensable pour des raisons de stabilité plus longue et de meilleures conditions de transport et de stockage.

Pour résoudre ce but, la présente invention réside dans la combinaison des caractéristiques suivantes:

a) la colle contient au moins 33% en poids de fibrinogène;

b) le rapport du facteur XIII à la teneur en fibrinogène, exprimé en unité du facteur XIII par gramme de fibrinogène, est au moins égal à 80;

c) dans la protéine totale, le fibrinogène et l'albumine sont présents dans un rapport de 33 à 90 : 5 à 40;

d) la colle présente une teneur en inhibiteur-activateur- plasminogène ou inhibiteur de plasmine, avantageusement en aprotinine de l'ordre de 250 à 25.000 unités de désactivateur de callicréine (KIE) par gramme de fibrinogène; et

e) la préparation est lyophilisée.

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, la colle pour tissu contient d'autre part de la glycine qui permet une meilleure dissolution du produit

lyophilisé.

D'autre part, la colle pour tissus conforme à l'invention peut contenir du glucose ou du saccharose qui sont des composants activant également la dissolution de la préparation.

- La colle conforme à l'invention peut d'autre part contenir 0,2 à 200 unités UI d'héparine par gramme de fibrinogène, ce qui permet d'obtenir une activité de stabilisation.

La colle pour tissus conforme à l'invention présente des propriétés caractéristiques de réticulation après dissolution, qui peuvent être déterminées par la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-lauryl-sulfate de sodium (SDS). Le test est exécuté de manière à ce qu'après mélange de la colle pour tissus avec un volume égal d'une solution contenant 40 mol CaCl_2 et 15 unités NIH (unité de l'Institut National Américain de la Santé-US National Institute of Health) de thrombine par millilitre, le mélange est mis à incuber à 37°C . Le degré de réticulation est déterminé après arrêt de la réaction et clivage par réduction des ponts de disulfure contenus dans les protéines, par addition d'un mélange d'urée, de dodecylsulfate de sodium et de β -mercaptoéthanol, par électrophorèse sur gel. Pour la colle pour tissus conforme à l'invention, la réticulation complète des chaînes de fibrine- γ après 3 à 5 minutes et une réticulation d'au moins 35% des chaînes de fibrine- α au bout de 2 heures, sont caractéristiques.

Le fibrinogène, l'albumine et la globuline non-solubles au froid dans la protéine totale doivent présenter, dans la colle pour tissus conforme à l'invention, un rapport défini qui s'élève à : 33 à 90 : 5 à 40 : 0,2 à 15.

La présente invention concerne d'autre part un procédé de fabrication de la colle décrite partant d'un cryoprécipité de plasma, qui se caractérise en ce qu'à partir du cryoprécipité, par un traitement simple ou répété avec une solution tampon contenant du citrate de sodium, du chlorure de sodium, de la glycine, du glucose

et un inhibiteur-activateur de plasminogène ou un inhibiteur de plasmine et de l'héparine, on sépare la protéine du plasma soluble au froid, en ce que l'on dissout le précipité épuré, que l'on ajoute de l'albumine humaine et qu'ensuite
5 on traite la solution par lyophilisation.

Avantageusement, le cryoprécipité est préparé à partir de plasma frais humain ou animal qui a été congelé à -20°C . En augmentant la température jusqu'à $0-2^{\circ}\text{C}$, on peut récupérer le cryoprécipité et le séparer par centrifugation. Après élution simple ou répétée du précipité avec
10 la solution-tampon qui présente un pH de 6 à 8,0, ce précipité est élué puis centrifugé à $0-4^{\circ}\text{C}$, pour éliminer la protéine de plasma soluble au froid. Le traitement avec la solution-tampon est exécuté jusqu'à
15 ce que l'on obtienne le rapport voulu du facteur XIII au fibrinogène.

Le précipité épuré est dissout dans une autre solution-tampon qui contient de l'albumine humaine, de la glycine et le cas échéant du glucose ou du saccharose,
20 un inhibiteur-activateur du plasminogène et un inhibiteur de la plasmine ainsi que de l'héparine et qui présente un pH de 6,5 à 9,0, et ce précipité est ensuite dilué pour atteindre une concentration en protéine de 4,0 à 9,0%. La solution est alors filtrée à l'aide de filtres à
25 membrane présentant une dimension de pores pouvant atteindre $0,2\mu\text{m}$, elle est mise en flacons définitifs puis lyophilisée.

La colle pour tissus lyophilisée ainsi obtenue peut être stockée à température ambiante et avantageusement
30 à $+4^{\circ}\text{C}$. Après reconstitution avec une eau injectable (aqua ad injectabilia), à laquelle on peut sélectivement ajouter un inhibiteur-activateur de plasminogène ou inhibiteur de plasmine, avantageusement de l'aprotinine, la colle est prête à l'emploi. Au cours de la mise en
35 solution de la préparation lyophilisée, il faut veiller à ce que la solution prête à l'emploi contienne au moins 70 milligrammes de fibrinogène par millilitre.

La colle pour tissus conforme à l'invention peut être universellement utilisée. Elle peut servir à relier sans suture des parties de tissus ou d'organes humains ou d'animaux, pour refermer des blessures et arrêter les hémorragies ainsi que pour améliorer le processus de guérison des blessures. Les domaines d'application préférentiels pour lesquels la colle conforme à l'invention peut être utilisée avec succès, sont les suivants :

Indication au niveau de la chirurgie du cou, nasale, des oreilles et de la mâchoire, stomatologie, neurochirurgie, chirurgie plastique, chirurgie générale, chirurgie abdominale, chirurgie du thorax et artérielle, orthopédie, chirurgie traumatologique, urologie, ophtalmologie et gynécologie.

Avantageusement, avant application de la colle conforme à l'invention sur les tissus à réunir, on ajoute à ladite colle un mélange de thrombine et de chlorure de calcium ou on applique ce mélange sur le tissu à traiter.

L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description qui va suivre faite en référence à un exemple de réalisation de l'invention.

On porte à une température de + 2°C 21 litres de plasma frais humain congelé à - 20°C. Le cryoprécipité obtenu (435 g) a été séparé par centrifugation à + 2°C et traité également à une température de + 2°C, avec 4,3 litres d'une solution tampon présentant un pH de 6,5 qui contient 6,6 g de citrate $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,4 g de NaCl, 10,0 g de glycine, 13,0 g de glucose. $1\text{H}_2\text{O}$, 50.000 unités KIE d'aprotinine et 200 unités UI d'héparine par litre, pour être ensuite à nouveau centrifugé à + 2°C. Le précipité séparé est dissous dans une autre solution tampon à pH 7,9, qui contient 35,0 g d'albumine humaine, 20,0 g de glycine, 50.000 unités KIE d'aprotinine et 200 unités UI d'héparine par litre, puis dilué à une concentration de 70 mg protéine par ml.

Ensuite, la solution est filtrée dans des conditions de stérilité à l'aide de filtres à membrane dont la dimension des pores peut atteindre $0,2\mu\text{m}$, mise dans les flacons définitifs, à raison de respectivement 2,2 ml, puis congelée et lyophilisée. Après reconstitution du produit lyophilisé à une concentration de fibrinogène de 90 mg/ml, la préparation d'une colle pour tissus prête à l'emploi a montré dans un test de réticulation, une réticulation complète de la fibrine γ après 5 minutes et une réticulation de la fibrine α de 66% après 2 heures, à une température de 37°C .

Le rapport des protéines contenues dans la colle pour tissus, du fibrinogène à l'albumine et à la globuline non soluble au froid a été établi à 64,0 : 22,3 : 7,7. La teneur en héparine était de 4,5 unités UI par g de fibrinogène. L'aprotinine était présente à raison d'une concentration de 1133 unités KIE par gramme de fibrinogène. La teneur en facteur XIII était de 161 unités par gramme de fibrinogène. La teneur en protéine totale dans la préparation lyophilisée s'élevait à 72,2% et la teneur en fibrinogène dans la préparation lyophilisée à 46,2%.

Les valeurs précitées ont été déterminées de la manière suivante : la détermination des unités du facteur XIII a été réalisée à l'aide d'un test de réticulation dans lequel on a utilisé comme substrat du fibrinogène exempt de facteur XIII et pour lequel on s'est servi de la réticulation de la fibrine provoquée par l'addition de l'échantillon dilué non précisé comme mesure pour la quantité de facteur XIII contenu. Une courbe d'étalonnage correspondante a été obtenue avec un mélange (pool) de plasmas humains citratés, et par définition 1 millilitre de plasma contient une unité du facteur XIII. Les déterminations quantitatives de protéine ont été menées suivant la méthode de Kjeldahl.

La détermination des protéines les unes par rapport aux autres a été réalisée également suivant la méthode électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

(laurylsulfate de sodium), à savoir a) avec un échantillon non-réduit de la colle pour tissus conforme à l'invention et b) avec un échantillon réduit au β -mercaptoéthanol de ladite colle.

- 5 Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée au mode de réalisation décrit qui n'a été donné qu'à titre d'exemple. En particulier, elle comprend tous les moyens constituant des équivalents des moyens décrits ainsi que leurs combinaisons si celles-ci sont exécutées suivant
- 10 son esprit et mises en oeuvre dans le cadre de la protection comme revendiquée.

Dans la présente description, unité U.I signifie "Unité internationale".

R E V E N D I C A T I O N S

1.- Colle pour tissus à base de protéines humaines et animales, contenant du fibrinogène et du facteur XIII, caractérisée par la combinaison des caractéristiques
5 suivantes :

a) la colle contient au moins 33% en poids de fibrinogène,

b) le rapport du facteur XIII au fibrinogène, exprimé en unité du facteur XIII par gramme de fibrinogène,
10 est au moins égal à 80,

c) dans la protéine totale, le fibrinogène et l'albumine sont présents à un rapport de 33-90:5-40,

d) la colle présente une teneur en inhibiteur-activateur du plasminogène ou inhibiteur de la plasmine,
15 à notamment en aprotinine, égale à 250-25.000 unités KIE par gramme de fibrinogène,

e) la préparation obtenue est lyophilisée.

2.- Colle selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient en plus de la glycine.

20 2.- Colle selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle contient en plus du glucose ou du saccharose.

4.- Colle selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle contient 0,2 à 200 unités U.I.
25 d'héparine par gramme de fibrinogène.

5.- Colle selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée par une réticulation complète des chaînes de fibrine γ par incubation au bout de 3 à 5 minutes et par une réticulation au moins égale à 35% des chaînes
30 de fibrine α après incubation de 2 heures, ceci étant déterminé par la méthode électrophorèse sur gel polyacrylamide-laurylsulfate de sodium, après dissolution de la préparation lyophilisée.

6.- Colle selon l'une des revendications 1 à 5,
35 caractérisée en ce que le rapport du fibrinogène à

l'albumine et à la globuline non-soluble à froid dans la protéine totale est de 33-90:5-40:0,2-15.

7.- Procédé de fabrication d'une colle pour tissus selon l'une des revendications 1 à 6 à partir d'un
5 cryoprécipité de plasma, caractérisée en ce que du cryo-précipité, par traitement simple ou répété avec une solution tampon qui contient du citrate de sodium, du chlorure de sodium, de la glycine, du glucose et un
10 inhibiteur-activateur du plasminogène ou inhibiteur de la plasmine et de l'héparine, on sépare la protéine de plasma soluble au froid, en ce que on dissout le précipité épuré, et on ajoute de l'albumine humaine et que l'on lyophilise la solution.

8.- Application d'une colle selon l'une des
15 revendications 1 à 7 pour relier sans suture, des parties de tissus ou d'organes humains ou d'animaux, pour refermer les blessures, arrêter les hémorragies et accélérer le processus de guérison des blessures.

9.- Application de la colle selon la revendication
20 8, caractérisée par la disposition suivant laquelle avant application de ladite colle sur les tissus à réunir, on ajoute à ladite colle un mélange de thrombine et de chlorure de calcium ou on applique ce mélange sur le tissu.

These known preparations are not, however, fully satisfactory since they do not sufficiently meet all the requirements imposed on such glue for tissues, which are the following:

a) high resistance to the stress of gluing or cicatrization of wounds with effective and durable arrest of hemorrhages, i.e. good adhesion of the glue on the surfaces of the wound or tissue, as well as high internal resistance of said glue;

b) adjustable gluing stability in the body;

c) possible total resorption of the glue during the wound healing process;

d) properties promoting the healing of the wound.

This seems to be partially attributable to the fact that the coagulation factors necessary for arresting hemorrhaging in the known preparations do not show reciprocally the optimal ratio and also to the fact that the fibrinolytic activity in the gluing zone is insufficiently controlled. Premature dissociation of the gluing of tissues due to the enzymatic activity is often observed.

Therefore, the purpose of this invention is to eliminate these disadvantages and problems and to create a glue for lyophilized tissues of human or animal origin, which broadly meets the above-mentioned requirements and is in lyophilized form, this form being indispensable for reasons of longer stability and matter transportation and storage conditions.

The glue for tissues in accordance with the invention can be used universally. It can be used for joining without suture human or animal parts of tissues or organs, to close wounds and arrest hemorrhaging, as well as to improve the healing process of wounds. The preferential areas of application for which the glue according to the invention can be successfully used are the following:

8. Application of a glue according to one of the claims 1 through 7 to join without suture parts of human or animal tissues or organs, to close wounds, arrest hemorrhages and accelerate the wound healing process.